

A2

**DEMANDE
DE CERTIFICAT D'ADDITION**

(21)

N° 81 17937

Se référant : au brevet d'invention n° 80 16914 du 31 juillet 1980.

(54) Procédé de production d'un collagène macromoléculaire biologiquement actif et produit obtenu.

(51) Classification internationale (Int. Cl. ³). C 07 G 7/00; A 61 K 37/12.

(22) Date de dépôt..... 23 septembre 1981.

(33) (32) (31) Priorité revendiquée : *EUA, 24 septembre 1980, n° 6/190 372.*

(41) Date de la mise à la disposition du
public de la demande..... B.O.P.I. — « Listes » n° 12 du 26-3-1982.

(71) Déposant : Société dite : SETON COMPANY, résidant aux EUA.

(72) Invention de : Gheorghe Cioca.

(73) Titulaire : *Idem* (71)

(74) Mandataire : Rinuy, Santarelli,
14, av. de la Grande-Armée, 75017 Paris.

Certificat(s) d'addition antérieur(s) :

La présente demande est un certificat d'addition à la demande de brevet français N° 8 016 914 déposée le 31 Juillet 1980 par la même Demanderesse.

L'invention a trait au collagène, et elle concerne plus particulièrement du collagène macromoléculaire reconstitué en fibre.

L'expression "collagène insoluble naturel" utilisée dans le présent mémoire désigne du collagène qui ne peut pas être dissous dans une solution aqueuse alcaline ou dans toute solution de sel inorganique sans modification chimique et comprend les peaux de grands animaux, les couches de peaux fendues et autres peaux de mammifères ou de reptiles. L'expression "collagène naturel insoluble" désigne plus particulièrement le corium qui est la couche intermédiaire d'une peau de bovidé entre le côté grain et le côté chair.

Le collagène constitue le tissu conjonctif et représente le type principal de protéine fibreuse chez les vertébrés supérieurs. Le collagène, dans son état naturel, existe en un enroulement de triples chaînes présentant une périodicité constante entre les triples chaînes alignées. La configuration en triples chaînes hélicoïdales du collagène est parfois dénommée fibrille et les fibrilles s'alignent avec une périodicité axiale d'environ 64 nm.

Bien qu'il existe plusieurs types de collagène, le type principal, appelé "type I", représente le collagène principal de la peau, des os et des tendons. La composition des chaînes du collagène du type I est de la forme $[a1(I)_2 \alpha 2]$. Les chaînes $a1(I)$ et $\alpha 2$ sont homologues.

Chez les jeunes animaux, la réticulation intermoléculaire et interfibrillaire est faible, ce qui crée un certain degré de solubilité du collagène. Toutefois, pendant le processus de vieillissement, une réticulation tant intermoléculaire qu'interfibrillaire a lieu, rendant ainsi le collagène insoluble.

L'utilisation de collagène sous la forme sensiblement pure a été proposée pour de nombreuses applications, par exemple pour panser des brûlures comme décrit dans les brevets des Etats-Unis d'Amérique N° 3 939 831 et N° 3 514 518, et pour des applications médicales similaires comme décrit dans les brevets des Etats-Unis d'Amérique

N° 3 157 524 et N° 3 628 974, et on a aussi proposé de l'utiliser comme additif pour les produits d'alimentation.

Bien qu'il soit connu que le collagène peut être purifié par la dépolymérisation du collagène insoluble naturel ainsi que par sa reconstitution subséquente, les rendements ont été assez faibles et le produit résultant n'est pas nécessairement doué d'activité biologique.

Le brevet des Etats-Unis d'Amérique N° 3 637 642 illustre un procédé de dissolution du collagène insoluble et de régénération de la fibre.

En outre, le collagène et les substances apparentées ont trouvé des applications dans le domaine de l'alimentation, des produits cosmétiques et des produits pharmaceutiques.

On a proposé de plus des procédés de solubilisation et de reconstitution du collagène par l'utilisation d'enzymes qui rompent les liaisons intrafibrillaires et interfibrillaires comme décrit dans le brevet des Etats-Unis d'Amérique N° 3 034 852. On a proposé en outre des procédés de transformation de masses fibreuses de collagène en une matière en feuille, comme décrit dans les brevets des Etats-Unis d'Amérique N° 2 934 447 et N° 2 934 446.

Conformément aux brevets des Etats-Unis d'Amérique N° 3 939 831 et N° 3 742 955, des pansements médicaux peuvent être préparés à partir de collagène dans lequel des antibiotiques et des substances similaires sont dispersés en vue d'activer la guérison de la peau qui a été brûlée.

Le brevet principal propose un procédé de dissolution et de régénération de fibre de collagène, qui élimine sensiblement la totalité des impuretés de la source de collagène et qui donne comme produit un collagène sensiblement pur qui est biologiquement actif et sensiblement non antigénique.

Du collagène macromoléculaire reconstitué est préparé par traitement de collagène insoluble naturel avec une solution aqueuse comprenant un sulfate de métal alcalin et un hydroxyde de métal alcalin pendant au moins 48 heures

pour saponifier les graisses en suspension dans le collagène insoluble naturel. Le collagène dégraissé est ensuite traité avec une solution aqueuse renfermant un sulfate de métal alcalin, pendant au moins 4 heures pour stabiliser les liaisons interfibrillaires entre des chaînes polypeptidiques individuelles. Le collagène est ensuite dissous dans une solution acide aqueuse, et la solution est congelée à une vitesse d'abaissement de la température de 18 à 24°C/heure, et de préférence, de 20°C/heure jusqu'à une température de -60 à -70°C. Le collagène congelé est déshydraté sous vide (133,3 à 1,33 mPa) pendant au moins 16 heures en vue de l'obtention d'un collagène biologiquement actif. Diverses matières douées d'activité biologique peuvent être ajoutées à la solution acide aqueuse avant la congélation.

Le collagène obtenu comme produit peut ensuite être implanté, par exemple dans un animal, et la substance active peut être libérée lentement. Le produit peut séjourner dans l'organisme biologique et il s'y dissout lentement par suite d'une digestion enzymatique et du fait d'autres processus biologiques.

Les sulfates alcalins que l'on peut utiliser conformément au brevet principal sont les sulfates de métaux alcalins tels que le sulfate de sodium, le sulfate de potassium et les sulfates de métaux alcalino-terreux tels que le sulfate de calcium, le sulfate de magnésium, etc. Le sulfate de métal alcalin que l'on apprécie le plus est le sulfate de sodium. Les hydroxydes de métaux alcalins utiles à la mise en oeuvre de la présente invention sont l'hydroxyde de sodium et l'hydroxyde de potassium, notamment l'hydroxyde de sodium. Les hydroxydes de métaux alcalino-terreux tels que l'hydroxyde de calcium et l'hydroxyde de magnésium peuvent remplacer en partie les hydroxydes de métaux alcalins. Toutefois, on doit prévoir une quantité suffisante d'hydroxyde de potassium et/ou d'hydroxyde de sodium.

La solution aqueuse du sulfate alcalin et de l'hydroxyde de métal alcalin renferme 1 à 2,5 proportions molaires d'hydroxyde de métal alcalin, 0,5 à 1 proportion molaire de sulfate alcalin et 0,1 à 0,5 proportion molaire d'autres sels ; elle renferme notamment 2,0 à 2,5 proportions

molaires d'hydroxyde de métal alcalin, 0,9 à 1,0 proportion molaire de sulfate alcalin et 0,1 à 0,2 proportion molaire d'autres sels. L'hydroxyde et le sulfate de métal alcalin doivent avoir un pH initial d'environ 12 à 13.

- 5 Les autres sels peuvent comprendre un chlorure de métal alcalin tel que le chlorure de sodium et le chlorure de potassium, des chlorures de métaux alcalino-terreux tels que le chlorure de magnésium, le chlorure de calcium, etc. On doit s'efforcer de calculer correctement la proportion de sulfate alcalin relativement à l'hydroxyde de
- 10 métal alcalin pour réaliser une saponification totale des graisses en suspension dans le collagène naturel insoluble tout en retenant les caractéristiques naturelles du collagène et en limitant le gonflement des fibres de collagène.
- 15 Si l'on utilise une trop grande quantité d'hydroxyde de sodium, le collagène est dénaturé et les liaisons intermoléculaires sont rompues. Si l'on utilise une quantité insuffisante d'hydroxyde de sodium, le collagène obtenu comme produit retient des impuretés telles que des graisses
- 20 et d'autres matières hydrolysables qui sont indésirables.

- Dans le traitement du collagène insoluble naturel avec la solution aqueuse de sulfate alcalin et d'hydroxyde de métal alcalin, le collagène insoluble naturel doit être découpé en morceaux suffisamment petits pour que la solution aqueuse puisse s'y imprégner et y réagir. Les morceaux
- 25 de collagène naturel doivent avoir un volume égal ou inférieur à environ 10 cm^3 , et leur volume est de préférence égal ou inférieur à 5 cm^3 . En outre, le traitement doit être conduit à la température ambiante pendant au moins 48 heures
- 30 en vue de saponifier entièrement la totalité des graisses en suspension dans le collagène insoluble naturel et de produire un degré uniforme de gonflement de la fibre de collagène. On doit faire en sorte que le traitement initial avec le sulfate alcalin et l'hydroxyde de métal alcalin ne
- 35 soit pas trop prolongé, sinon les chaînes polypeptidiques sont attaquées et le collagène est dénaturé. Par exemple, lorsque le collagène insoluble naturel est découpé en morceaux de 5 cm^3 , le traitement initial ne doit pas durer

plus de 96 heures, sinon la fibre de collagène se dégrade en composants de plus bas poids moléculaire et elle est dénaturée. Après ce traitement initial, le collagène insoluble naturel devient très mou et transparent.

- 5 Lorsque la première solution de traitement a été enlevée, le collagène est traité avec une solution d'un sulfate de métal alcalin ou de métal alcalino-terreux, ou un mélange des deux, à un pH sensiblement neutre. La concentration du sulfate doit être égale à environ 0,5-1,0 M.
- 10 D'autres sels, tels que le chlorure de sodium, le chlorure de potassium, le chlorure de magnésium, etc., peuvent être ajoutés à ce traitement par des sels du moment qu'une quantité suffisante de sulfate de métal alcalin, de préférence de sulfate de sodium, est utilisée pour stabiliser les
- 15 liaisons interfibrillaires du collagène. Ce traitement avec le sel de métal alcalin doit avoir une durée d'au moins 4 heures.

- De préférence, le collagène est ensuite neutralisé avec une solution acide aqueuse de pH compris entre 3 et 4.
- 20 Les acides utilisés pour former cette solution aqueuse sont normalement l'acide borique, l'acide tartrique, l'acide acétique, etc. Le lavage a une durée d'environ 6 heures, pour éliminer les sels et les constituants basiques résiduels. Le pH du collagène après la neutralisation est égal
- 25 à 7 environ.

- Le collagène est ensuite lavé à l'eau de ville. Pour éliminer les sels qui restent dans le collagène, on lave ce dernier plusieurs fois à l'eau distillée. De préférence, chaque cycle de lavage dure environ 4 heures.
- 30 Après chaque cycle d'une durée de 4 heures, l'eau est enlevée par décantation et de l'eau fraîchement distillée est ajoutée. Normalement, 4 à 7 cycles sont nécessaires pour éliminer les sels résiduels.

- Le collagène est ensuite dissous dans une solution acide aqueuse ; on prépare de préférence une solution
- 35 contenant 1 à 1,5 % en poids de collagène. Les acides utiles pour dissoudre la fibre de collagène sont les acides organiques faibles tels que les acides acétique, citrique,

lactique, ascorbique et tartrique. On ajuste de préférence le pH à une valeur inférieure à 4 pour obtenir une bonne solubilité. Dans le cas de l'acide ascorbique, une solution à 1 % est suffisante, et dans le cas de l'acide acétique ou tartrique, il suffit d'une solution à 0,5 %. Le pH de la solution aqueuse doit être compris entre environ 3 et 4.

La solution de collagène est ensuite congelée, en vue de réduire sa température, à une vitesse d'abaissement de 18° à 24°C/heure jusqu'à ce que sa température ait une valeur de -60 à -70°C.

La congélation à une vitesse d'abaissement de la température de 18° à 24°C par heure est nécessaire pour que les cristaux de glace formés soient extrêmement petits et ne rompent pas notablement les chaînes de collagène en conférant au collagène, obtenu comme produit final, un poids moléculaire réduit.

Pour obtenir la vitesse désirée de congélation, on place la solution de collagène dans un congélateur à une température de -60 à -70°C.

La solution congelée est ensuite introduite dans un dispositif de déshydratation par congélation, à une température initiale de -60 à -70°C, et elle est sublimée sous vide (pression de 133,3 à 1,33 mPa). Le processus de déshydratation par congélation dure environ 12 à 24 heures, la température finale étant égale à 30°C.

En outre, bien que la congélation empêche une destruction extrême des chaînes de collagène, une légère proportion de destruction par le froid est inévitable en vue de former des sites de réaction et d'association qui créent la réticulation, en conférant au produit final une grande stabilité mécanique et enzymatique, et de manière que le collagène puisse être associé à d'autres additifs.

Le collagène préparé conformément à l'invention est un collagène dont le poids moléculaire a une moyenne en poids d'environ 450 000 et dont la périodicité axiale entre les fibrilles à triples chaînes hélicoïdales se situe entre environ 75 et 85 nm, et notamment à environ 80 nm, contre

une périodicité d'environ 64 nm pour le tropocollagène. On constate le fait surprenant que le collagène préparé conformément à l'invention garde sensiblement la même activité biologique que le collagène naturel qui a été
5 purifié par des opérations longues et pénibles.

Le produit préparé conformément à l'invention est une masse tenace spongieuse.

En outre, le poids moléculaire moyen du collagène préparé conformément à l'invention a une valeur de
10 383 000 à 460 000, comparée à la valeur de 300 000 que l'on trouve pour le tropocollagène. Le collagène préparé conformément à l'invention comprend 4 à 6 % de chaînes polypeptidiques ayant un poids moléculaire de 30 000 à 60 000 et 8 à 12 % de chaînes ayant un poids moléculaire
15 de 1 000 000 à 1 500 000.

Selon un autre aspect de l'invention, on peut ajouter des matières biologiquement actives à la solution ou dispersion de collagène avant la congélation. Ces matières peuvent être des médicaments ou des substances si-
20 milaires. Du fait que les articles de collagène produits conformément à l'invention se rapprochent du collagène naturel ou reconstitué, la libération de la substance biologiquement active par le collagène se rapproche de l'absorption de la matière par un organisme biologique
25 dans lequel le collagène est implanté ou au contact duquel le collagène se trouve.

On pense que la rupture de chaînes polypeptidiques au cours de la congélation entraîne la formation de radicaux qui s'associent à des médicaments particuliers et qui peuvent
30 donc être libérés in vivo.

En outre, après que du collagène renfermant un médicament a été implanté et que le médicament s'est épuisé le collagène est lentement dissous et/ou décomposé par digestion enzymatique ou par un autre processus biologique, ce
35 qui élimine donc la nécessité d'enlever l'implant.

Une application particulière du procédé de préparation d'articles de collagène utiles dans la mise en oeuvre de l'invention est le blocage de l'oestrus chez les animaux

Une hormone convenable telle que l'acétate de chlormadinone, la diméthistérone, l'éthistérone, l'hydroxyprogestérone, le caproate d'hydroxyprogestérone, la médroxyprogestérone, la noréthindrone, le noréthynodrel, la progestérone, la 3-éthylènedioxy, 17-acétoxy, 6-méthyl-prégn-5-ène - 20-one, etc., est ajoutée à la solution ou dispersion de collagène avant la congélation. L'hormone est ajoutée en une quantité efficace pour bloquer l'oestrus, de préférence en proportion de 1 partie pour 40 000 à 50 000 parties de solution de collagène.

L'article de collagène est introduit dans l'utérus de l'animal. Au bout de 14 à 18 jours, l'article de collagène est épuisé en hormone. Deux à sept jours après que l'application d'hormone a cessé, un oestrus accru se manifeste et l'animal peut alors être accouplé. A ce stade, on peut aussi procéder à l'insémination artificielle.

Dans une autre forme de réalisation, les antibiotiques tels que pénicilline, tétracycline, oxytétracycline, chlorotétracycline, chloramphénicol, des sulfamides, etc., peuvent être ajoutés en même temps que l'hormone pour prévenir une infection au cours de l'insémination et de la grossesse subséquente.

Deux à quatorze jours après l'insertion de l'article en collagène, le processus enzymatique dans l'utérus commence à dégrader biochimiquement le collagène. Du glutaraldéhyde peut être ajouté au collagène pour accroître le temps nécessaire à la dégradation biochimique.

Dans une autre application des articles de collagène réalisés conformément à l'invention du brevet principal, un spermicide tel que le nonylphénoxy polyoxyéthylène éthanol) est ajouté conformément à la présente addition à la solution de collagène de la même façon que l'on ajoute une hormone. L'article de collagène peut être inséré dans le vagin et le spermicide détruit le sperme injecté dans le vagin et le spermicide détruit le sperme injecté dans le vagin en s'opposant ainsi à la conception. Les enzymes présents dans le vagin dissolvent lentement le collagène, si bien que le retrait de la garniture n'est pas

nécessaire. De plus, comme décrit précédemment, du glutaraldéhyde ou d'autres agents de réticulation peuvent être ajoutés au collagène pour réduire la vitesse de dissolution du collagène in vivo.

5 Une forme de réalisation de la présente invention implique l'addition d'un antibiotique, d'un bactériostatique, ou d'un bactéricide à la dispersion ou solution de collagène avant la congélation. Après la lyophilisation, l'article de collagène peut être utilisé pour la guérison de brûlures ou
10 de lésions similaires.

En général, divers médicaments peuvent être ajoutés à la dispersion de collagène et l'article en collagène peut être implanté en vue de produire des effets biologiques, physiologiques ou psychologiques dans le système biologique
15 auquel il est implanté.

D'autres détails de l'invention ressortent des exemples particuliers suivants.

EXEMPLE 1

On découpe en morceaux de 5 cm³ 1 kg de corium
20 provenant de peaux de vaches à l'état brut. Les morceaux de 5 cm³ sont traités dans une cuve avec une solution de composition suivante :

	<u>Incrédient</u>	<u>Quantité</u>
	Eau	3000 ml
25	Hydroxyde de calcium	150 g
	Hydroxyde de potassium	50 g
	Hydroxyde de sodium	100 g
	Sulfate de sodium	144 g
	Chlorure de sodium	100 g
30	Chlorure de potassium	200 g
	Sulfate de calcium	100 g

Le collagène insoluble naturel est traité dans
35 la solution ci-dessus sous agitation pendant 48 heures. L'examen et les essais après traitement montrent la saponification de toutes les graisses et un degré uniforme de gonflement du collagène. Le corium devient très mou, transparent et poreux.

La solution est évacuée de la cuve de traitement et une seconde solution de composition suivante est chargée dans la cuve :

	<u>Ingrédient</u>	<u>Quantité</u>
5	Eau	6000 ml
	Sulfate de sodium	144 g
	Chlorure de sodium	100 g
	Chlorure de potassium	100 g
	Sulfate de calcium	100 g

10 On traite le corium avec la solution de sulfate de sodium pendant au moins 4 heures pour stabiliser les liaisons interfibrillaires de collagène.

On évacue la seconde solution de la cuve à travers un filtre et on recharge la cuve avec une solution de 15 3000 ml d'eau et 90 g d'acide borique pour laver et acidifier le corium traité deux fois. Ce traitement dure 6 heures, jusqu'à ce que le collagène ait un pH neutre. On sépare le collagène du liquide et on le traite avec 10 litres d'eau de ville, pendant 4 heures. On évacue l'eau de ville 20 et on traite à nouveau le collagène avec 15 litres d'eau distillée pendant au moins 4 heures pour en éliminer par lavage tous sels résiduels; on verse l'eau par décantation et on ajoute 15 litres d'eau distillée. On répète cette 25 opération jusqu'à ce que six cycles de lavage aient été accomplis. On dissout le collagène dans 10 litres d'acide ascorbique à 1 % et on agite la solution jusqu'à consistance homogène. On verse la solution de collagène dans des moules de 1 cm de hauteur et de 2,5 cm de diamètre. On congèle les moules à une température de -60 à -70°C pour 30 effectuer une réduction de température du collagène à une vitesse de 20°C par heure, jusqu'à une température de -60°C.

Le collagène est ensuite lyophilisé à une température initiale de -60°C et à une température finale de 30°C après 16 heures.

Le collagène préparé conformément à l'Exemple 1 a un poids moléculaire moyen de 450 000. La période axiale entre les fibrilles de collagène est d'environ 80 nm.

Le collagène préparé conformément à l'Exemple 1 est facilement digéré par la collagénase et il ne présente aucune activité antigénique dans les essais.

Le collagène préparé conformément à l'Exemple 1 a de bonnes propriétés mécaniques, comme l'élasticité, la compressibilité et la tendreté.

EXEMPLE 2

On répète le mode opératoire de l'Exemple 1 à la différence qu'on ajoute 0,025 g d'acétate de médroxyprogesterone à 1000 ml de la solution de collagène avant de la verser dans les moules.

Les pastilles de collagène dans lesquelles l'hormone est uniformément dispersée sont implantées dans l'utérus de vaches afin d'y déclencher l'oestrus. Du fait de la complexation du collagène avec l'hormone, cette dernière est libérée en une période de 2 à 14 jours. Après cette période, les vaches sont soumises à l'insémination artificielle. L'implant de collagène est laissé dans l'utérus et se dissout lentement par suite de sa digestion enzymatique.

EXEMPLE 3

On répète le mode opératoire de l'Exemple 2 à la différence qu'on ajoute 0,25 g de Chloromycétine à la dispersion de collagène avant la lyophilisation.

La Chloromycétine a pour effet d'empêcher une infection du bétail au cours de l'insémination et de la grossesse subséquente.

Il va de soi que la présente invention n'a été décrite qu'à titre explicatif mais nullement limitatif, et que de nombreuses modifications peuvent y être apportées sans sortir de son cadre.

REVENDECATIONS

1. Procédé de production d'une fibre de collagène reconstitué macromoléculaire suivant la revendication 1 de la demande de brevet français N° 8 016 914 consistant :

- 5 (a) à traiter du collagène insoluble naturel avec une solution aqueuse renfermant un sulfate alcalin et un hydroxyde de métal alcalin, pendant au moins 48 heures pour saponifier les graisses en suspension dans le collagène insoluble naturel et pour faire gonfler uniformément les
10 fibres de collagène ;
- (b) à traiter le collagène dégraissé avec une solution aqueuse comprenant un sulfate de métal alcalin pendant au moins 4 heures pour stabiliser les liaisons interfibrillaires ;
- 15 (c) à dissoudre le collagène dans une solution aqueuse ;
- (d) à ajouter une quantité efficace d'une substance biologiquement active à ladite solution ;
- (e) à congeler ladite solution pour réduire sa
20 température à une vitesse de 18 à 24°C par heure ; et
- (f) à déshydrater la solution sous vide (pression de 133,3 à 1,33 mPa) pendant au moins 12 heures, caractérisé en ce que ladite substance biologiquement active est un spermicide.
- 25 2. Un collagène régénéré ayant un poids moléculaire moyen de 383 000 à 460 000, dont 4 à 6 % des chaînes polypeptidiques ont un poids moléculaire de 30 000 à 60 000 et 8 à 12 % des chaînes polypeptidiques ont un poids moléculaire de 1 000 000 à 1 500 000 et contenant une petite
30 quantité d'une substance biologiquement active, caractérisé en ce que ladite substance biologiquement active est un spermicide.
3. Produit collagène, caractérisé en ce qu'il est
35 et d'un spermicide.